

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200126048

UDC _____

学 位 论 文

肿瘤细胞中视黄酸受体与孤儿受体 相互作用的不同模式

**Distinct role and functional mode of retinoid
receptors and orphan receptors in carcinoma cells**

叶晓峰

指导教师姓名: 吴 乔 研究员

申请学位级别: 理 学 硕 士

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2004 年 7 月 23 日

论文答辩时间: 2004 年 8 月 7 日

学位授予单位: 厦 门 大 学

学位授予日期:

答辩委员会主席: 陈奕欣教授

评 阅 人: _____

2004 年 8 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：叶晓峰

2004年8月7日

目 录

摘要.....	1
Abstract.....	2
前言	
一、视黄素受体家族成员.....	4
二、视黄酸的信号途径.....	7
三、孤儿受体 TR3	11
1、TR3 家族结构特征.....	11
2、TR3 转录活性的调节.....	12
3、TR3 介导的细胞凋亡.....	14
四、本文的研究目的和内容.....	16
材 料 与 方 法	
一、材料.....	18
二、方法.....	19
1、细胞培养.....	19
2、药物处理.....	20
3、细胞凋亡分析.....	20
4、MTT 法测定细胞生长抑制.....	20
5、细胞周期分布的测定.....	21
6、免疫荧光分析.....	21
7、细胞瞬时转染.....	21
8、细胞稳定转染.....	22
9、RNA 提取与 Northern Blots.....	22
10、蛋白提取与 Western Blots.....	24

11、凝胶阻滞测定.....	25
12、氯霉素乙酰转移酶 CAT 活性测定.....	26
结 果 与 分 析	
一、ATRA 对乳腺癌和胃癌细胞生长的调控.....	28
二、TR3 表达介导 ATRA 诱导乳腺癌细胞凋亡.....	31
三、不同的异源二聚体介导 ATRA 的信号转导过程.....	34
四、RXR α /TR3 核浆转运与细胞凋亡相关性.....	37
五、RAR α 对胃癌细胞周期进程的调节作用.....	42
讨 论 与 结 论.....	46
参 考 文 献.....	50
个 人 简 历.....	62
致 谢.....	64

TABLE OF CONTENTS

Abstract in Chinese.....	1
---------------------------------	----------

Abstract.....	2
----------------------	----------

Introduction

I 、 Family members of retinoid acid receptors.....	4
---	----------

II 、 Retinoids singal pathway.....	7
---	----------

III、 Orphan receptor TR3	11
---------------------------------------	-----------

1、 Structure of TR3 family members.....	11
---	----

2、 Transcriptional regulation of TR3.....	12
---	----

3、 Cell apoptosis mediated by TR3.....	14
--	----

IV、 Purpose of This Thesis.....	16
--	-----------

Materials and Methods

I 、 Materials.....	18
---------------------------	-----------

II 、 Methods.....	19
--------------------------	-----------

1、 Cell culture.....	19
----------------------	----

2、 Drug treatment.....	20
------------------------	----

3、 Apoptosis analysis.....	20
----------------------------	----

4、 MTT assay.....	20
-------------------	----

5、 Cell cycle analysis.....	21
-----------------------------	----

6、 Immunofluorescence analysis.....	21
-------------------------------------	----

7、 Tansient transfection	21
--------------------------------	----

8、 Stable transfection.....	22
-----------------------------	----

9、 RNA preparation and Northern Blots.....	22
--	----

10、 Protein preparation and Western blots.....	24
--	----

11、Gel retardation assay.....	25
12、CAT activity assay.....	26
Results	
I 、Growth inhibition of MCF-7 and MGC80-3 cells by ATRA.....	28
II 、Sufficient TR3 expression is essential to induce apoptosis.....	31
III 、Different heterodimer mediates distinct signaling pathway of ATRA.....	34
IV 、Translocation of RXR α /TR3 is closely associated with apoptosis induction by ATRA.....	37
V 、ATRA regulation of cell cycle is mediated by RAR α in gastric cancer cells.....	42
Discussion and Conclusion.....	46
Reference.....	50
Resume.....	62
Acknowledgements.....	64

摘 要

全反式视黄酸 ATRA 能够调节肿瘤细胞生长、分化和凋亡。ATRA 主要通过它的受体 RARs 和 RXRs 发挥功能。在 ATRA 存在下, RARs 和 RXRs 形成异源二聚体, 由此调节视黄酸应答元件 RARE 下游靶基因的表达。此外, 还有一些孤儿受体也参与了 ATRA 的信号途径, 例如 TR3。这些受体如何在不同细胞内介导 ATRA 信号途径还有待于进一步研究。

本文研究发现, ATRA 能够同时抑制乳腺癌细胞 MCF-7 和胃癌细胞 MGC80-3 的生长, 但 ATRA 抑制两种肿瘤细胞生长的机制却完全不同。运用凋亡形态分析和流式细胞术, 我们发现 ATRA 是通过诱导 MCF-7 细胞凋亡来抑制乳腺癌细胞生长, 而在胃癌 MGC80-3 细胞中则通过诱导细胞停滞在 G0/G1 期来抑制细胞生长。进一步研究发现在 MCF-7 细胞中, 由于 TR3 的高表达有利于 RXR α 与之形成异源二聚体而介导 ATRA 的作用; 但在 MGC80-3 细胞中, 由于 RAR α 的高表达有利于 RAR α /RXR α 异源二聚体形成而介导 ATRA 作用。在乳腺癌细胞 MCF-7 中, ATRA 能够诱导 TR3/RXR α 从细胞核转运到细胞浆, 并调控凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bcl-xl 和 Bax 的表达, 进而诱导细胞凋亡; 特异性的核蛋白输出抑制剂 LMB 可以抑制 ATRA 诱导 TR3 和 RXR α 的转运, 同时抑制了 ATRA 对 Bcl-2、Bcl-xl 和 Bax 表达的调控, 细胞的凋亡率也从 38.4% 下降到和对照组相近的水平 5.2%。在胃癌细胞中, ATRA 不能诱导 RAR α 、RXR α 和 TR3 的转运, 因此不能诱导胃癌细胞凋亡。但是 ATRA 通过 RAR α 的介导诱导细胞停滞在 G0/G1 期, 从而抑制细胞生长。当胃癌细胞转染反义 RAR α 表达载体后, MGC80-3 细胞由对 ATRA 敏感转变为对 ATRA 抗性。

本论文揭示了孤儿受体 TR3 对肿瘤细胞凋亡诱导的功能作用, 阐明了 ATRA 通过对 TR3 转录后水平的调控途径诱导乳腺癌细胞凋亡的新机制。为视黄酸在肿瘤的临床治疗中提供了实验和理论依据。

关键词: 全反式视黄酸; 视黄酸受体, 凋亡, 细胞周期

Abstract

All-trans retinoic acid (ATRA) affects cell proliferation, differentiation and apoptosis through its receptors, RARs and RXRs. Besides these, other receptors such as orphan receptor TR3 are also involved in the regulatory process of ATRA. However, how different receptors function in response to ATRA is still largely unknown.

In the present study, we found that formation of TR3/RXR α heterodimers in the nucleus and their subsequent translocation into the cytoplasm, in association with regulation of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bcl-xl and Bax, was critical for apoptosis induction by ATRA in breast cancer cells MCF-7. When translocation of TR3 and RXR α were blocked by Leptomycin B (LMB), ATRA-induced apoptosis was consequently abolished. However, in ATRA-induced gastric cancer cells MGC80-3, RXR α heterodimerised with RAR α but not with TR3, and remained in the nucleus exerting its effect on cell cycle regulation. When transfected with antisense-RAR α , MGC80-3 cells changed from ATRA-sensitive to ATRA-resistant and most cells were arrested in the S phase, implying the importance of RAR α in cell cycle regulation. Furthermore, we demonstrated that the effects of ATRA depend on the relative levels of TR3, RAR α and RXR α expression in cancer cells. In ATRA-induced MCF-7 cells, highly expressed TR3 favours the formation of TR3/RXR α and promotes the TR3/RXR α signaling pathway to cause apoptosis; while in ATRA-induced MGC80-3 cells, high expression of RAR α favours the formation of RAR α /RXR α and promotes the RAR α /RXR α signaling pathway in mediating cell cycle regulation. In conclusion, these results reveal the novel mechanism that cellular expression and location of protein is associated with

diverse signaling transduction pathways and the resultant physiological process. Also, those provide new treatment approaches for breast and gastric cancer in clinic.

Keywords: All-trans retinoic acid (ATRA); Retinoid receptors ; Apoptosis ; Cell cycle

前 言

视黄素(retinoid)是维他命A的衍生物,包括天然或者人工合成的化合物,一般以视黄酸,视黄醛和视黄醇的形式存在^[1]。视黄素能够调节许多关键的生命活动过程,例如胚胎发育、视觉形成、繁殖、骨骼形成、新陈代谢、造血、分化、增殖和凋亡^[2-6]。在实验动物中,视黄素可以抑制多种类型肿瘤的发生,例如口腔癌、皮肤癌、膀胱癌、肺癌、前列腺癌和乳腺癌^[3,4,6-8]。临床上,视黄素能够逆转头、颈部肿瘤及黑色素瘤病人的早期癌变和抑制继发性肿瘤的产生^[9]。这些研究证实了视黄素可以用于治疗和防治癌症。全反式视黄酸(all trans-retinoid acid, ATRA)(图1)已被美国FDA(Food and Drug Administration)批准用于急性早幼粒细胞白血病的临床治疗^[10]。

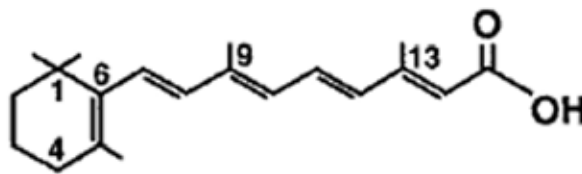


图 1, 全反式视黄酸分子结构式^[11]

Fig. 1 Structure of all trans-retinoid acid.

一、视黄素受体家族成员

1987 年 Petkovich 和 Giguere 各自领导的实验小组同时发现了视黄酸受体 (retinoid acid receptors, RARs)^[12,13]。另一类视黄素 X 受体(retinoid X receptors, RXRs)在 1990 年也被发现^[14]。RARs(能被 ATRA 和 9-cis RA 激

活)和 RXRs(只能被 9-cis RA 激活)属于类固醇/甲状腺激素受体超家族成员, 它们由三种不同的基因 α 、 β 和 γ 编码, 形成不同的受体亚类^[15,16]。

与其它核受体一样, RARs和RXRs分子结构都可分为A/B、C、D、E和F 五个区(图2)^[17,18]。A/B 区是氨基端, 为不依赖于配体的细胞组织特异性的转录激活自调节区。C 区是DNA 结合区(DNA Binding Domain ,DBD), 由66个氨基酸组成, 参与二聚体的形成; 这个区域保守性最高, 含有8个半胱氨酸组成的两个锌指, 每个锌指形成一个 α 螺旋, 相互垂直, 构成DBD的核心, 这种锌指结构在核受体家族中普遍存在^[19]。E 区较大, 被称为配

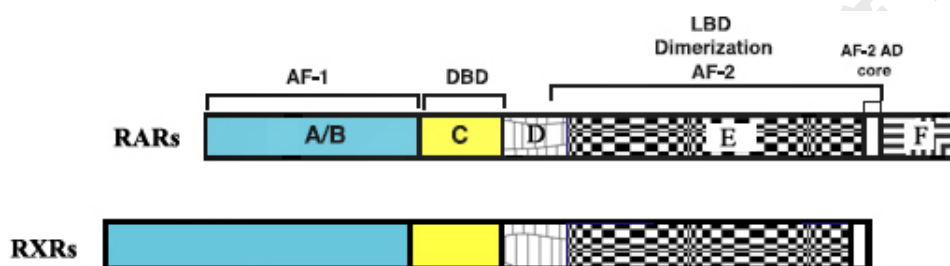


图 2, RARs 和 RXRs 结构示意图

Fig.2 Structure of RARs and RXRs

体结合区(Ligand Binding Domain ,LBD), 由220 个氨基酸组成, 含有12个 α 螺旋和一个 β 折叠, 形成了一个三层的反平行的螺旋三明治结构(图3)^[20,21]; E区主要功能是参与配体的识别和二聚体的形成, 也具有调节A/B区的功能。D 区是由46个氨基酸组成的疏水区, 连结着LBD和DBD区, 保证DBD可以旋转, 产生多种构象改变而不发生原子排列的障碍; 同时, D区还包含有入核序列, 影响受体核定位^[22]。F 区则是RARs 的羧基末端, 与受体自身的稳定性及抗原性有关, 在RXRs中则没有F区^[23,24]。

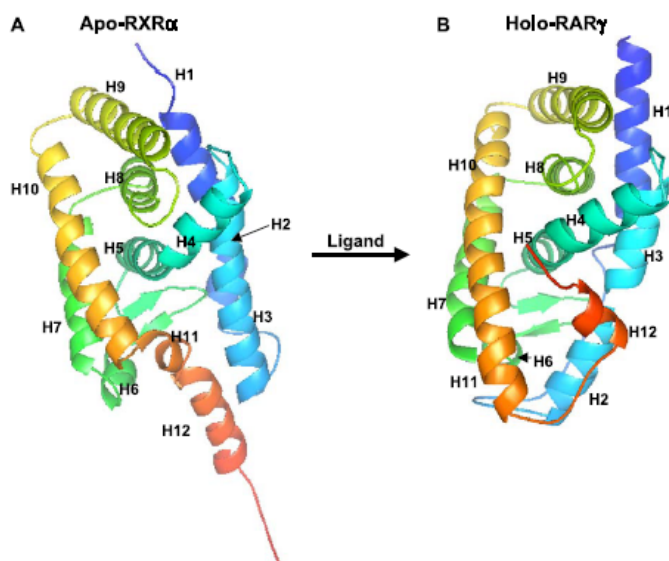


图3 , RXR α 和RAR γ 的配体结合区域的三级结构示意图^[20,21]

Fig.3 The crystal structures of the apo-RXR α and holo-RAR γ ligand-binding domains.

在RAR亚类(RAR α 、 β 和 γ)中,各区氨基酸的组成是不相同的,其中,C和E区的同源性最高(97%和90%);D区同源性为74%;而A/B区和F区同源性较小,仅为31-37%;F区的组成及长度差别更为明显,在RAR结构中这是一个较为特殊的区域。RXRs相应的功能区则与RARs相似。

RAR α 、RAR β 和RAR γ 的基因分别定位在第17号染色体的q21带、第3号染色体p24带和第12染色体上^[25,26]。而RXR α 、RXR β 和RXR γ 分别定位在第9号染色体q34.3带、第6号染色体p21.3带和第1号染色体q22-23带上^[27]。

RAR α mRNA在大多数组织中表达;RAR β 只在神经组织中表达,在皮肤中很少表达;而RAR γ 主要在皮肤中表达。RXRs在成人的组织中广泛表达:RXR β 在很多组织中都有表达,但表达量不高;而RXR α 在肝、肾、脾和皮肤丰富表达;RXR γ 主要在脑和肌肉中表达^[16]。视黄酸受体RARs在肿瘤组织的表达也有许多相关报道。对头颈部磷状癌(HNSCC)患者调查发现,

RAR γ 、RXR α 和RXR β 在患者的癌旁正常组织和癌组织间表达水平相同，而RAR α 在癌旁正常组织表达量为94%，在癌组织表达量却下降到77%；差异最明显的是RAR β ，它从正常组织的70%下降到癌组织的35%^[28]。其它对非小细胞肺癌(NSCLC)^[29-31]、乳腺癌^[32,33]、口腔癌^[34]、食管癌^[35]、前列腺^[36]和宫颈癌^[37]患者的调查也都得到类似的结果，即当RAR β 的表达水平下降时，正常组织就发生癌变。由此可见，RARs表达水平的高低对多数肿瘤的发生和发展起了关键的作用。

二、视黄酸的信号途径

视黄酸主要通过其受体RARs和RXRs发挥作用。在乳腺癌细胞中，RAR β 基因低表达导致细胞丧失对视黄酸的敏感性^[38]。在胃癌细胞中，RAR α 是调节细胞增殖的关键分子，当RAR α 表达量降低也会导致视黄酸丧失抑制肿瘤细胞增殖的作用^[39,40]。因此，那些对视黄酸不敏感的肿瘤细胞可能正是缺少RARs的表达。

在视黄酸配体存在时，RARs和RXRs形成异源二聚体RAR/RXR，也可以形成同源二聚体RXR/RXR。RARs不能结合到视黄酸应答元件(RA responsive element, RARE)上，必须通过辅助蛋白RXRs的协助，与RARs形成异源二聚体后才能结合到RAREs上^[41,42]。一般来说，ATRA与RAR/RXR异源二聚体结合，选择性激活RARs；而9-cis RA可以同时和RXR/RXR同源二聚体和RAR/RXR异源二聚体结合，选择性激活RXRs^[43,44]。激活后的RARs或RXRs与RAREs结合，调控相应靶基因的转录和表达。RARE是存在于靶基因5'末端启动子及调控序列中的一段特殊DNA序列，它们通常含有被不等的碱基对间隔的两段保守的AGGTCA或类似的基元序列(motif)，该基元序列也被称为半位点(half-site)。从1990年发现 β RARE至今已有30多种的RARE被发现^[45]。不同的RAREs具有不同的半位点间隔、基元序列的走向(图4)。例如，RAR β 2基因由五个碱基对间

隔,称为 DR5, CRABP I 和 CRABP II 基因由一个或两个碱基对间隔,称为 DR2 或 DR1。RAR/RXR 异源二聚体结合到 DR2 和 DR5 类型的应答元件时,一般 RXR 在 5'端, RAR 在 3'端^[15,46]。只有当 RAR/RXR 异源二聚体结合到 DR1 类型的应答元件时, RAR 位于 5'端,而 RXR 位于 3'端。此时, RAR/RXR 异源二聚体由通常的激活转录活性变为抑制转录活性^[22]。

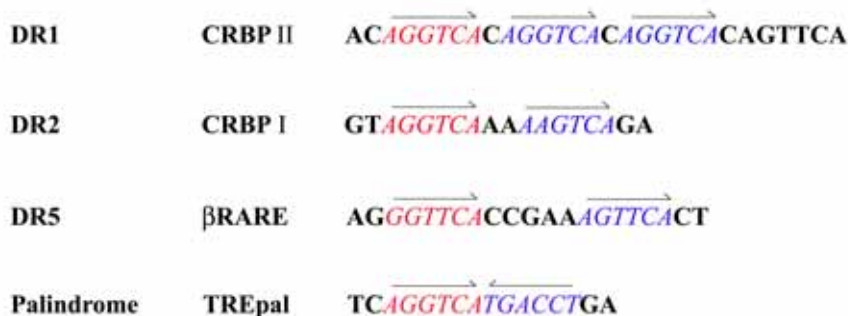


图 4, 视黄酸应答元件序列。^[47-50]

Fig.4, Sequence of RAREs.

近年来, 视黄酸受体的辅助激活蛋白(coactivators)和辅助阻遏蛋白(corepressors)的发现揭示了视黄酸介导其受体调控下游靶基因转录的机制。如图 5 所示, 在配体不存在时, RAR/RXR 异源二聚体和 RARE 结合的同时还和辅助阻遏蛋白 NCoR、SMRT 结合, 增强了组蛋白脱乙酰基酶的活性, 使得组蛋白去乙酰化, 由此抑制转录进程^[51]。当 RAR/RXR 异源二聚体和配体结合后, 由于二者的 LBD 构象发生改变, 辅助阻遏蛋白发生解离。配体和视黄酸受体的结合不仅有利于 RXR 和 RAR 之间的结合, 还为 RXR 和 RAR 异源二聚体提供了辅助激活蛋白结合的平台, 促进二聚体和辅助激活蛋白 (CBP/p300, SRC/p160, CARM-1 和 ACTR) 的结合, 随后激活了组

蛋白的乙酰化、甲基化，导致染色质去凝聚，同时发生了 ATP 供能的染色质重组^[52]。最终，RAR/RXR 异源二聚体和辅助激活蛋白复合体解离，进而和 SMCC(Srb and Mediator protein containing complex)结合。SMCC 可以介导 RNA 聚合酶 II 和其它转录因子和 RAR/RXR 异源二聚体结合，启动转录调控。^[53]

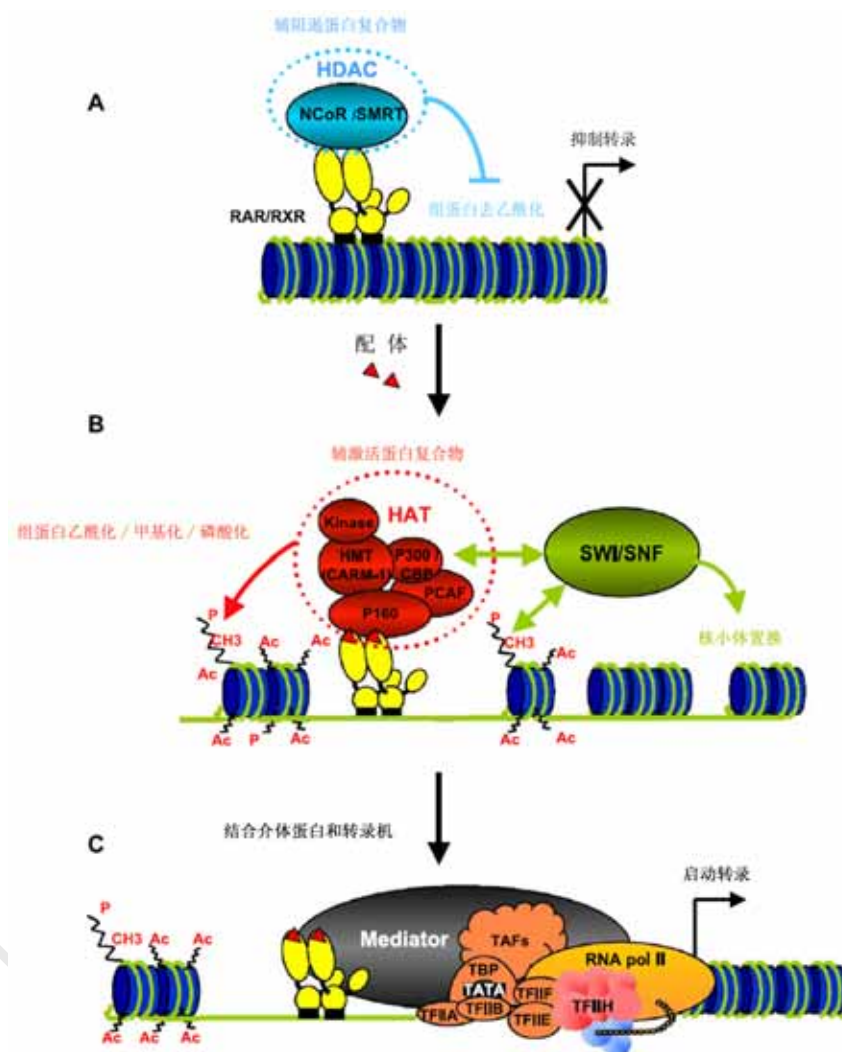


图5，视黄酸受体转录激活的模式图^[22]

Fig.5 Mechanism of retinoid receptor action.

除了与 RAR 形成异源二聚体外, RXR 还可以和多种激素受体形成异源二聚体。因此视黄酸可以调控一系列的激素应答基因。而且由于视黄酸的靶基因启动子还包含有其他转录因子的序列, 因此视黄酸受体可以和其他转录因子协同转录来激活下游靶基因的表达。例如, 在视黄酸存在下, RARs 可以和 SP1/SP3 共同转录激活 CYP26 的表达^[54]; 而在白细胞介素 3 存在下, STAT5 和 RARs 共同作用, 最大化地转录激活视黄酸的靶基因^[55]。

视黄酸信号途径还与其它细胞信号转导途径密切相关。例如, 视黄酸可以抑制 AP-1 的活性^[56]; 视黄酸受体可以抑制癌基因 β -catenin 介导的基因转录, 尽管视黄酸受体的抑制机制是通过与 β -catenin 竞争结合到转录元件上还是诱导 β -catenin 的蛋白酶水解还存在争议^[57,58]; 在 HL-60 细胞中, 视黄酸和 TGF- β 共同激活 p42/44 MAP 激酶, 从而降低 Smad 的磷酸化水平, 抑制 Smad 的活化^[59]; RAR γ 的拮抗剂可以诱导 RAR γ 和 Smad 的结合, 从而促进 TGF- β 下游靶基因的活化^[60]; 最近, Bastien 和 Rincon 等人发现视黄酸不仅可以抑制 PI3K/AKT 信号途径, 而且可以通过诱导 IRS-1(Insulin receptor substrate-1)去磷酸化和降解来拮抗与类胰岛素生长因子促有丝分裂有关的 IGF-IR/PI3K/AKT 信号途径^[61]。

RXR 作为激素受体家族的辅助蛋白, 还可以和甲状腺激素受体(TR)、维生素 D 受体(VDR)、过氧化酶增殖体激活受体 PPAR、法呢醇 X 受体 FXR、肝 X 受体 LXR、安息香酸 X 受体(BXR)、连续雄烷受体 β (CAR β)、孕烷受体(PXR)、类固醇暨异质物受体 (SXR)形成异源二聚体, 协助它们和相应的激素应答元件结合^[62]。早期研究认为, RXR 不能与二聚体中另一个激素受体的配体结合, RXR 只是起辅助蛋白的作用, 因而被称为沉默子(silencer)。比如异源二聚体 TR/RXR, RAR / RXR, VDR/RXR 中的 RXR。然而, 最近 Li 等人报道, 在 TR/RXR 异源二聚体中, RXR 通过和配体 9-cis RA 结合, 导致细胞内与 TR 结合的辅助阻遏蛋白发生解离, 其机制可能是诱导 TR 的构象发生改变, 从而间接调节结合配体的 TR 转录活性^[63,64]。Prüfer 等人报道, 当 RXR 和 VDR 配体不存在时, RXR α 与 VDR 形成异源二聚体并调节

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库